

肝臓同時切除術後の Interleukin-10 の誘導および 肝再生抑制の機序に関する検討

著者	及川 昌也
号	1762
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/22148

氏 名（本籍）おい かわ まさ や
及 川 昌 也

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学位記番号 医博第 1762 号

学位授与年月日 平成 13 年 3 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
(博士課程) 外科学系専攻

学 位 論 文 題 目 肝臓同時切除術後の Interleukin-10 の誘導および
肝再生抑制の機序に関する検討

(主 查)

論文審査委員 教授 松野正紀 教授 里見進

教授 篠澤 洋太郎

論文内容要旨

研究目的

われわれは1995年よりrat肝臓同時切除術後に肝再生が遷延すること、その機序として、肝臓同時切除後の門脈血中には肝再生を抑制する蛋白性因子が存在すること、その際に血中IL-10濃度が上昇することを明らかにしてきた。本研究では、肝臓同時切除術後のIL-10高値と肝再生抑制との因果関係を明らかにすることを目的とする。

研究方法

Sprague-Dawley系雄性ratを用い①Higgins-Andersonの方法による70%肝切除を施行した群(Hx)②Richardsらの方法に準じ脾組織の60%に相当するgastric segmentとsplenic segmentを切除しかつ70%肝切除を施行する肝臓同時切除群(HPx)③HPxに脾摘を併施する肝臓脾同時切除群(HPSx)の3つの手術モデルを作製した。それぞれの術後門脈血中IL-10濃度を測定すると同時に、肝臓でのIL-10 mRNA発現をRT-PCR法により解析した。またHPxに追加した脾摘が肝再生に与える効果を、再生肝のBrdU Labeling indexから検討した。

さらに*in situ*酵素灌流法にNycodenz濃度勾配遠心、counterflow centrifugal elutriationを組み合わせ、SD系雄性ratの肝臓から肝細胞、非実質細胞(NPC)、純度を90%以上に精製したKupffer細胞、星細胞を単離した。それぞれの単独培養、または、NPC-肝細胞、Kupffer細胞-肝細胞混合培養系を作製し、HxおよびHPx術後1時間の血清で刺激することで、術後早期の環境を再現した。血清刺激した培養上清でのIL-10濃度を測定、また培養細胞でのIL-10とTNF α のmRNAの発現をRT-PCR法により解析した。さらに、それぞれの刺激条件下での肝細胞DNA合成能を $[^3\text{H}]$ -thymidineの取り込みを指標に測定し、cytokine発現と対比した。またrecombinant IL-10のNPC-肝細胞共培養系でのDNA合成能に及ぼす直接効果を検討した。

研究結果

60%脾切除+70%肝切除によるHPxでは、術後3時間をpeakとして門脈血中IL-10濃度が上昇($44.0 \pm 8.6 \text{ pg/ml}$)した。脾摘を併施することにより、術後3時間の門脈血中IL-10濃度は $24.6 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$ と、Hx術後と同等の値($26.1 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$)まで低下した。しかし、BrdU Labeling indexのpeak値はHPx、HPSxともにHxに比較し低値で、peakに至る時間が遷延していた。再生肝ではHPx、HPSxともにIL-10 mRNAの発現が亢進および遷延しており、肝局所でのparacrine効果が想定された。

Kupffer 細胞, NPC の培養上清中 IL-10 濃度は, HPx 術後血清による刺激時には Hx 血清刺激に比較し有意に高値であった。NPC-肝細胞共培養系での [3 H]-thymidine の取り込みを指標とした DNA 合成能は, HPx 術後血清刺激時は $6.0 \pm 1.8 \times 10^5$ dpm/mg of protein で Hx 術後血清刺激時の $10.3 \pm 2.5 \times 10^5$ dpm/mg of protein に比較し有意に抑制されていた。しかし, Kupffer 細胞-肝細胞共培養系の DNA 合成能は Hx 術後血清刺激時には $7.8 \pm 1.4 \times 10^5$ dpm/mg of protein, HPx 術後血清刺激時には $9.1 \pm 1.0 \times 10^5$ dpm/mg of protein で両群間に有意差が認められず, NPC-肝細胞共培養系と異なる術後血清刺激への反応を示した。RT-PCR 法による解析では刺激血清の種類による mRNA 発現の明らかな差は認められなかった。術後血清刺激により, Kupffer 細胞, NPC では IL-10 mRNA の発現が誘導されたが, 肝細胞単独, また星細胞では IL-10 mRNA は検出されなかった。また, NPC-肝細胞共培養系に対する recombinant IL-10 の直接の抑制効果は認められなかった。

結 論

- 1) rat 肝臓同時切除術後は一過性の高 IL-10 血症を示す。
- 2) 肝臓同時切除に脾摘を付加することにより門脈血中 IL-10 値は低下するが, 肝再生抑制は解除されない。
- 3) recombinant IL-10 は肝細胞での DNA 合成には直接の抑制活性を持たない。
- 4) 肝臓での IL-10 産生の中心は Kupffer 細胞であるが, 肝再生が抑制されるためには Kupffer 細胞以外の非実質細胞分画の存在が重要である。

研究の意義・独創的な点

本研究により, 肝臓同時切除後に認められる高 IL-10 血症は, 直接肝再生抑制をもたらすのではないことが明らかとなった。さらに, 肝臓同時切除術後の肝臓での主な IL-10 産生細胞は Kupffer 細胞であること, その一方, 肝再生抑制に関与する細胞は, Kupffer 細胞以外の肝非実質細胞であることを新たに指摘している。肝臓同時切除術後の肝再生抑制に注目した独創的な研究であり, 充分学位に値するものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

rat 部分肝切除に脾切除を併施すると術後肝再生が抑制される。このいわゆる肝脾相関の機序に関して、力山らは肝脾同時切除後の門脈血中には肝再生を抑制する蛋白性因子が存在することを、さらに内山らは *in vivo* および *in vitro* での肝再生抑制系において Interleukin-10 (IL-10) 値の上昇を伴うことを報告した。これらの結果をふまえ、肝脾同時切除術後の IL-10 高値と肝再生抑制との因果関係の解析を本研究では行った。

SD 雄性 rat を用い ① 70%肝切除を施行した群 (Hx) ② 脾組織の60%に相当を切除しかつ 70%肝切除を施行する肝脾同時切除群 (HPx) ③ HPx に脾摘を併施する肝脾脾同時切除群 (HPSx) の 3 つの手術モデルを作製し、IL-10 の産生臓器である脾臓の摘出により肝再生抑制が解除されるかを検討した。脾摘を併施することにより、HPx 術後門脈血中 IL-10 濃度は Hx 術後と同等の値まで低下したが、BrdU Labeling index 値の改善は得られなかった。しかし HPx, HPSx 術後再生肝では Hx に比較して IL-10 mRNA の発現が亢進しており、肝局所での paracrine による抑制の可能性が示された。

ついで、この paracrine 機序の解析を目的とし、肝細胞、非実質細胞 (NPC), 純度を90%以上に精製した Kupffer 細胞、星細胞の分離培養を行い、さらに NPC-肝細胞、Kupffer 細胞-肝細胞混合培養系を作製し、Hx および HPx 術後血清で刺激することで術後早期の環境を再現した。培養上清での IL-10 濃度と、培養細胞での炎症性 cytokine の mRNA 発現を解析し、 $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みを指標とした肝細胞 DNA 合成能と対比した。また recombinant IL-10 の DNA 合成能に及ぼす直接効果を検討した。NPC-肝細胞共培養系での DNA 合成能は、HPx 術後血清刺激時で Hx 術後血清刺激時に比較し有意に抑制されていた。しかし、Kupffer 細胞-肝細胞共培養系の DNA 合成能は Hx 術後血清刺激時と HPx 術後血清刺激時の両群間に有意差が認められず、NPC-肝細胞共培養系と異なる反応を示した。IL-10 による抑制効果を想定していたが、刺激血清の種類による IL-10 mRNA 発現の明らかな差は示されず、また、NPC-肝細胞共培養系に対する recombinant IL-10 の DNA 合成抑制効果は認められなかった。

IL-10 による肝再生抑制の可能性については否定的な結果が得られたが、一方で、再生抑制に関与する細胞は Kupffer 細胞以外の肝非実質細胞であることを新たに指摘しており、本領域における新たな方向性を示したと考えられる。先行する研究から得られた実験仮説に対する論理的な解析がなされており、学位論文に値する研究といえる。